

Prof. dr hab. Anna Herman-Antosiewicz
Katedra Biologii i Genetyki Medycznej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 28.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Hajtuch
pt. Ocena wpływu funkcjonalizowanych nanocząstek srebra na układ hemostazy oraz
aktywność przeciwbakteryjną w badaniach in vitro i ex vivo

(Evaluation of the impact of functionalized silver nanoparticles on the hemostasis system
and antibacterial activity in in vitro and ex vivo studies)

Choroby układu krążenia, które są jedną z głównych przyczyn zgonów ludzi na świecie, często związane są z nieprawidłowym funkcjonowaniem śródbłonna naczyń i wzmożoną produkcją zkrzepu. Patologiczna agregacja płytek krwi prowadząca do zatorów w naczyniach towarzyszy nie tylko chorobom układu krążenia ale i innym stanom patologicznym, jak np. choroby nowotworowe czy neurodegeneracyjne. Hospitalizacja, procedury medyczne i przede wszystkim stosowanie dożylnych portów u osób przewlekle chorych może nasilać ten stan, również poprzez wzmożone ryzyko zakażeń drobnoustrojami. Istnieje dość dużo leków przeciwkrzepliwych, ale mają one szereg wad, min. mają krótki czas półtrwania, zakłócają hemostazę i wymagają optymalizacji dawkowania u pacjentów, aby nie wywołać efektu odwrotnego, tj. nadmiernego krwawienia. Stąd poszukuje się bardziej optymalnych terapeutów. Wśród nich popularne są ostatnimi laty nanocząstki, które mogą być stosowane jako leki, nośniki leków, materiał do pokrywania urządzeń medycznych czy produkcji protez. Choć nanocząstki mają wiele potencjalnych zastosowań, nie do końca poznane są ich właściwości w aspekcie wpływu na procesy krzepnięcia krwi.

Pani mgr Justyna Hajtuch wiedząc, że nanocząstki srebra (AgNPs) mają udokumentowane działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe, bakterii i grzybów oraz że mogą dostarczać leki lub być stosowane w produkcji medycznych urządzeń, postanowiła zbadać ich wpływ na układ hemostazy. Dla poprawy ich właściwości farmakologicznych i biokompatybilności były funkcjonalizowane kwasem liponowym (LA), glikolem polietylenowym (PEG), glutationem (GSH) lub łączone z eptyfibatydem, lekiem przeciwplateczkowym. Swoje badania Doktorantka wykonała w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Inkielewicz-Stępnia z tej jednostki oraz prof.

Marii Jose Santos-Martinez ze School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences and School of Medicine Trinity College Dublin. Badane nanocząstki były syntetyzowane i charakteryzowane pod względem fizykochemicznym przez badaczy z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Rozprawa doktorska jest przedstawiona w postaci czterech spójnych tematycznie, wieloautorskich publikacji. Są one skomentowane w obszernym Streszczeniu przygotowanym w językach polskim i angielskim. Zawiera ono następujące rozdziały: Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Cele pracy, Materiały i Metody, Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Podsumowanie i Wykaz cytowanego piśmiennictwa. Tu mam kilka uwag technicznych. W wykazie skrótów w języku polskim Doktorantka nie trzymała się jednolitości zapisu, tj. nie zawsze jest podana informacja, że skrót pochodzi ze słów w j. angielskim. Jest parę nieprawidłowych lub mało zgrabnych sformułowań, np. str. 8 - „...prowadzi do zwiększenia aktywności fosfatazy w komórkach mięśni gładkich, która następnie hydrolizuje miozynę”, str. 12 – „Niepożądane właściwości pro- i antykoagulacyjne NPs stanowią obawy w dziedzinie nanomedycyny”, str. 13 – „połączenie AgNPs z innymi związkami (...) prowadzi do efektu synergistycznego, który może potencjalnie pomóc w opracowaniu nowych bardziej skutecznych i bezpiecznych opcji terapeutycznych”, str. 14 i 24 „... względem komórek naczyń śródbłonna...”, str. 24 – „...zatem zrównoważone i zawansowane podejście do syntezy oraz badań biologicznych może stanowić realną alternatywę w medycynie”.

Prace składające się na rozprawę doktorską mgr Hajtuch zostały opublikowane w latach 2019-2022 w bardzo dobrych czasopismach o międzynarodowym zasięgu. Dowodzi to, że przeszły ocenę ekspertów, zatem ja mogę jedynie przybliżyć najważniejsze ich rezultaty.

Publikacja w *International Journal of Nanomedicine* z 2019 r. (IF2019=5,115; punkty ministerialne=140), pt. *Effects of functionalized silver nanoparticles on aggregation of human blood platelets*, przedstawia uzyskanie i charakterystykę fizykochemiczną AgNPs funkcjonalizowanych LA, GSH lub PEG, co pozwoliło to na dobranie takich warunków, aby działanie nanocząstek hamujące agregację płytek krwi było najefektywniejsze. Płytki były izolowane od pacjentów i badane m.in. w warunkach zbliżonych do tych panujących w naczyniach *in vivo* przy pomocy techniki z mikrowagą z kryształem kwarcu i monitorowaniem rozpraszania energii. Badane nanocząstki hamowały aktywację płytek krwi, czemu towarzyszyły zmiany w ilości receptorów selektyny P i GPIIb/IIIa, tromboksanu A2 (TXB2) oraz uwalnianych MMP-1 i MMP-2. Jednocześnie, użyte preparaty nie wpływały na integralność błony cytoplazmatycznej płytek krwi, fibroblastów czy komórek śródbłonna.

W pracy opublikowanej we *Frontiers in Pharmacology* w 2022 r. (IF2022=5,988; punkty ministerialne=100), pt. *Lipoic acid-coated silver nanoparticles: biosafety potential on the vascular microenvironment and antibacterial properties* porównano działanie AgNPs nieopłaszczonych z

opłaszczonymi kwasem liponowym względem różnych gatunków bakterii będących powodem zakażeń szpitalnych i reprezentujących wielolekooporne szczepy, a także komórek śródbłonka naczyń, płytek krwi i czerwonych krwinek. Uzyskane wyniki wskazują, że sfunkcjonalizowane kwasem liponowym AgNPs zachowują aktywność antybakteryjną, choć ich MIC są 2-8 razy wyższe niż czystych AgNPs. Mechanizm działania obu typów cząstek polega m.in. na niszczeniu ścian komórkowych bakterii. Co ważne, sfunkcjonalizowane nanocząstki są bezpieczniejsze dla komórek ludzkich (nie indukują stresu oksydacyjnego, apoptozy komórek HUVEC, depolaryzacji błony mitochondrialnej komórek śródbłonka i płytek krwi, czy permeabilizacji czerwonych krwinek). Autorzy postulują, że ze względu na te właściwości opisane nanocząstki mogłyby być stosowane do powlekania powierzchni np. portów i cewników naczyniowych tym bardziej, że wykazano ich działanie przeciwzakrzepowe (publikacja nr 1).

Publikacja w *International Journal of Nanomedicine* z 2022 r. (IF2022=7,033; punkty ministerialne=140), pt. *The pharmacological effects of silver nanoparticles functionalized with eptifibatide on platelets and endothelial cells* pokazuje, że połączenie AgNPs z eptyfibatydem, lekiem blokującym receptory GPIIb/IIIa i hamującym agregację płytek krwi, jest bezpieczne dla komórek endotelialnych, erytrocytów i płytek krwi, a działa skuteczniej niż sam lek. Działanie przeciwrzepliwe opiera się na obniżeniu poziomów receptorów (selektyny P i GPIIb/IIIa), a także modulacji ilości wydzielanych pod wpływem trombiny przez komórki śródbłonka mediatorów krzepnięcia na korzyść hamowania tego procesu. Co ciekawe, badany preparat, w przeciwieństwie do samego leku, nie wpływa na mitochondrialny łańcuch oddechowy płytek krwi stymulowanych kolagenem.

W cyklu publikacji mgr Hajtuch znajduje się również praca przeglądowa pt. *Nanogrugs as a new approach in therapy of cardiovascular diseases and cancer with tumor-associated angiogenesis*, która została opublikowana w *Current Medicinal Chemistry* w 2021 r. (IF2021=4,74; punkty ministerialne=100). Stanowi ona bardzo obszerne i wartościowe omówienie zastosowania nanoterapeutyków, nie tylko w chorobach układu krążenia ale też w chorobach nowotworowych, gdzie celem terapii są zarówno komórki nowotworu, jak i mikrośrodowisko guza, w tym niewłaściwie funkcjonujące unaczynienie przyczyniające się do jego rozwoju, nieskuteczności leczenia czy powikłań po terapii.

Prace eksperymentalne miały jasno sformułowany cel, który został zrealizowany przy użyciu różnych modeli (*in vitro*, *ex vivo*, komórki krwi, śródbłonka naczyń, bakterii), różnorodnych i dobrze dobranych metod (m.in. technika QCM-D i agregometria świetlna, cytometria przepływowa, testy ELISA, mikroskopia elektronowa). Pokazują ciekawe wyniki o znaczeniu praktycznym. Podoba mi się dogłębna i dojrzała dyskusja z nakreśleniem ograniczeń każdej z prac. Wiadomo, że nie wszystko można wykonać od razu, zawsze można więcej i Autorzy nakreślają

obszary badań do kontynuacji. Pewien mój niedosyt budzi jedynie brak porównania działania funkcjonalizowanych nanocząstek z czystymi AgNPs w pracy nr 1 i nr 3. Zostało to natomiast wykonane w pracy nr 2. Mam też kilka pytań, które wynikają z ciekawości co do badanych przez mgr Hajtuch zagadnień. Czy Doktorantka sprawdzała wpływ AgNP-LA na wzrost biofilmu bakteryjnego? Czy inne typy funkcjonalnych grup (GSH, PEG) wpływają na działanie przeciwbakteryjne AgNPs? Schemat eksperymentów z zastosowaniem modyfikowanych AgNPs sugeruje ich zastosowanie w profilaktyce tworzenia skrzepu (dodawane były do płytek przed ich aktywacją). Czy Doktorantka próbowała użyć badanych preparatów po aktywacji płytek krwi czy śródbłonna, aby sprawdzić efekt leczniczy?

Do dokumentacji dołączone są oświadczenia współautorów poszczególnych prac. Informują oni o swoim udziale w powstaniu publikacji oraz zapewniają o wkładzie mgr Hajtuch w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentów, opracowanie i interpretację wyników. Szkoda, że nie ma oświadczeń samej Doktorantki. Opis tego, co sama wykonała pozwoliłby na dokładniejsze oszacowanie Jej samodzielnego wkładu. Niemniej, jest Ona pierwszą autorką w każdej z tych publikacji, co świadczy o wiodącej roli w ich powstaniu.

Wniosek końcowy

W mojej opinii oceniana praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Prezentowane w niej rezultaty są interesujące z naukowego punktu widzenia oraz mają potencjał aplikacyjny. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.).

Zwracam się zatem do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z prośbą o dopuszczenie mgr Justyny Hajtuch do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, ze względu na wysoki poziom naukowy prezentowanych publikacji oraz ich interdyscyplinarny charakter wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Anna Herman-Ankiewicz